

# Multivalente Antikörper-Konstrukte

**Publication number:** DE19819846 (A1)

**Publication date:** 1999-11-11

**Inventor(s):** LITTLE MELVYN [DE]; KIPRIYANOV SERGEJ [DE]

**Applicant(s):** DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE]

**Classification:**

**- international:** **G01N33/53; A61K39/395; C07K14/82; C07K16/00; C07K16/28; C12N15/09; G01N33/531; G01N33/53; A61K39/395; C07K14/82; C07K16/00; C07K16/18; C12N15/09; G01N33/531; (IPC1-7): G01N33/569; G01N33/574; C07K16/00; A61K39/395; C12N15/63**

**- European:** C07K14/82; C07K16/28A; C07K16/28A12; G01N33/531

**Application number:** DE19981019846 19980505

**Priority number(s):** DE19981019846 19980505

**Also published as:**

US7129330 (B1)  
US2007031436 (A1)  
US7507796 (B2)  
JP2002513805 (T)  
ES2296395 (T3)

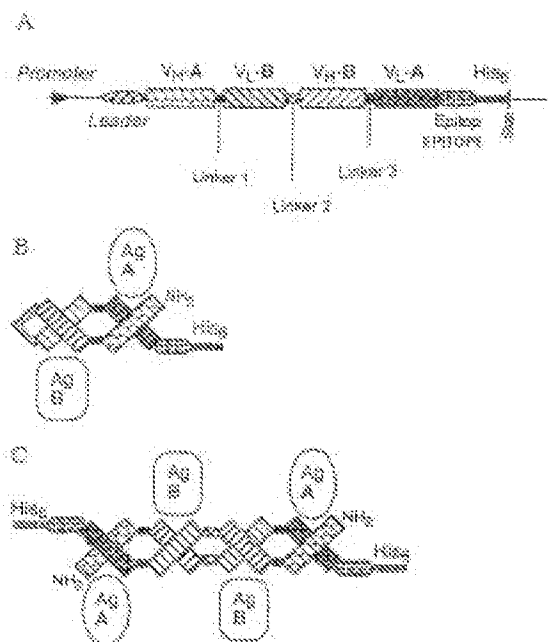
[more >>](#)

**Cited documents:**

WO9119739 (A1)

## Abstract of DE 19819846 (A1)

The invention relates to a multivalent Fv antibody construct comprising at least four variable domains which are connected to one another via peptide linkers 1, 2 and 3. The invention also relates to expression plasmids which code for such an Fv antibody construct. In addition, the invention relates to a method for producing the Fv antibody constructs and to the use thereof.



Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 198 19 846 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 198 19 846.9  
㉔ Anmeldetag: 5. 5. 98  
㉕ Offenlegungstag: 11. 11. 99

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 K 16/00**  
A 61 K 39/395  
C 12 N 15/63  
// G01N 33/569,  
33/574

**DE 198 19 846 A 1**

⑦① Anmelder:  
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des  
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE  
  
⑦④ Vertreter:  
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea  
Schüßler, 81825 München

⑦② Erfinder:  
Little, Melvyn, 69151 Neckargemünd, DE;  
Kipriyanov, Sergej, 69121 Heidelberg, DE  
  
⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
WO 91 19 739  
CA 119:157915a;  
CA 126:130370a;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Multivalente Antikörper-Konstrukte

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.

**DE 198 19 846 A 1**

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte, sie kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei V<sub>H</sub>- und zwei V<sub>L</sub>-Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V<sub>H</sub>- und einer V<sub>L</sub>-Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke einsetzbar macht.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10–30 Aminosäuren aufweist. Des weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt mit anderen F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d. h. multivalentes, F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck "F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen F<sub>V</sub>-Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt

mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzelkettigen F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d. h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d. h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0–10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem NH<sub>2</sub>-Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3–10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11–20 Aminosäuren, insbesondere 15–20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

Ein erfindungsgemäßes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1–5 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke "F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes F<sub>V</sub>-Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3 × 19-LL, pDISC3 × 19-SL, pPiC-DISC-LL und pPiC-DISC-SL. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- (a) ein erfindungsgemäßes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden. Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**Fig. 1** zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His<sub>6</sub>: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 2** zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird; His<sub>6</sub>: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (PelB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 3** zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-LL. 6 × His: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β-Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 4** zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-SL. 6 × His: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für βpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die V<sub>H</sub>- und V<sub>L</sub>-Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 5** zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete

Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19-LL kodierten bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His<sub>6</sub>-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 6** zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19-SL kodierten tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His<sub>6</sub>-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V<sub>H</sub> und V<sub>L</sub>: variable Region der schweren und der leichten Kette.

**Fig. 7** zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das tetravalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des Saccharomyces cerevisiae-α-Faktor-Sekretionssignals; V<sub>H</sub>: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

**Fig. 8** zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des Saccharomyces cerevisiae-α-Faktor-Sekretionssignals; V<sub>H</sub>: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

#### Beispiel 1

Konstruktion der Plasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukten in Bakterien

Die Plasmide pHOG-αCD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente codieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov et al., 1996, J. Immunol. Meth. 196, 51–62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov et al., 1997, Protein Eng. 10, 445–453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V<sub>H</sub>-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen Gly-Gly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCACACAGAATTCTTAGATCTATTAAAGAGGAGAAATTAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTTGGC, erzeugt (vgl. **Fig. 2**). Das PCR-Fragment 1 wurde mit EcoRI und EcoRV gespalten und mit dem mit EcoRI/EcoRV linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V<sub>L</sub>-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für ein c-myc-Epitop und einen Hexahistidynschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCA-

CACAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAAC-  
TCCA, und DP4, 5'-AGCACACTCTAGAGACACACA-  
GATCTTTAGTGAGGTGATGCTGATGTGAGTTTGA-  
G, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit HindIII und  
XbaI gespalten und mit dem durch HindIII/XbaI linearisier-  
ten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor  
pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. **Fig. 2**). Das für das hybride  
scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19  
wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-  
CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG  
und entweder Li-1, 5'-TATA-  
TACTGCAGCTGCACCTGGCTACCACCAC-  
CACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCC-  
AGAACCACCACCAGCGGCCGCAGCATCAGCC-  
CG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub>-inter-  
scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. **Fig. 2**) oder Li-2, 5'-  
TATATACTGCAGCTGCACCTGCGACCTGGGCCAC-  
CAGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines  
kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. **Fig.**  
2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3 × 19-LL  
und pDISC3 × 19-SL wurden durch Ligierung des NcoI/  
PvuII-Restriktionsfragments aus pHOG 19-3, umfassend  
das Vektorgerüst und die NcoI/PvuII-gespaltenen PCR-  
Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. **Fig. 3, 4**). Die vollstän-  
dige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw.  
tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte sind in den **Fig. 5**  
bzw. 6 angegeben.

#### Beispiel 2

Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-  
DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen  
bzw. tetravalenten, bispezifischen F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruk-  
ten in Hefe

##### (A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

Der Vektor pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande)  
zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen  
in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial ver-  
wendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cere-*  
*visiae* α-Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem  
Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem do-  
minanten selektierbaren Marker, Zeocin<sup>TM</sup>, der sowohl in  
*Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für  
das tetravalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) co-  
diert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3 × 19-SL  
unter Verwendung der Primer 5-PIC, 5'-  
CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAG-  
CAGTCTGGGGCTGAACTGGC, und pSEXBN 5'-  
GGTTCGACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG  
amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit  
EcoRI und XbaI gespalten und in mit EcoRI/XbaI lineari-  
siertes pPICZαA ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid  
pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequen-  
zen des tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes sind in  
**Fig. 7** gezeigt.

##### (B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der  
Grundlage von pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Nieder-  
lande) und pDISC3 × 19-LL (vgl. **Fig. 3**) durchgeführt. Die  
Plasmid-DNA pPICZαA wurde mit EcoRI gespalten. Die  
überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines  
Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufge-  
füllt. Die so erhaltene DNA wurde mit XbaI gespalten, und  
das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde

isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3 × 19-LL mit  
NcoI gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt.  
Nach der Spaltung mit XbaI wurde ein kleines Fragment,  
umfassend ein für den bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper kodieren-  
des Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgelei-  
teten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die  
Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F<sub>v</sub>-Antikör-  
per-Konstruktes sind in **Fig. 8** gezeigt.

#### Beispiel 3

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F<sup>II</sup>-Antikör-  
per-Konstruktes in Bakterien

*E. coli*-XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die  
mit den Expressionsplasmiden pDISC3 × 19-LL bzw.  
pDISC3 × 19-SL transformiert worden waren, wurden über  
Nacht in 2×YT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und  
100 mM Glucose (2×YT<sub>GA</sub>) bei 37°C gezüchtet. 1 : 50-Ver-  
dünnungen der Übernachtskulturen in 2×YT<sub>GA</sub> wurden als  
Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM ge-  
züchtet. Als die Kulturen einen OD<sub>600</sub>-Wert von 0,8 erreicht  
hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifuga-  
tion mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Vo-  
lumen eines frischen 2×YT-Mediums, das 50 µg/ml Ampi-  
cillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG  
wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt,  
und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20–22°C)  
18–20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige  
Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüber-  
stand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die  
löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden  
die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an  
eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA,  
pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1 stündigen Inkubation  
auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäropla-  
sten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der  
lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die  
Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Ma-  
terial als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und  
der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt,  
durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) ge-  
klärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammonium-  
sulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeeengt.  
Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g,  
4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens  
an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine im-  
mobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC)  
wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chela-  
tierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu<sup>2+</sup> beladen war  
und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer)  
equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde  
durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann  
mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Start-  
puffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm  
des Effluenten minimal war, gewaschen (etwa dreißig Sä-  
ulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM  
Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-  
Farbstoffbindungstest (1976, Anal. Biochem., 72, 248–254)  
unter Verwendung des Bio-Rad(München, Deutschland)-  
Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gerei-  
nigten tetravalenten bzw. bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Kon-  
strukte wurden aus den A<sub>280</sub>-Werten unter Verwendung der  
Extinktionskoeffizienten ε<sup>1mg/ml</sup> = 1,96 bzw. 1,93 bestimmt.

## Beispiel 4

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris*

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10 pg Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit SacI linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100 pg/ml Zeocin™ enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-myc-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert.

Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

## Beispiel 5

Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes

## (A) Größenausschlußchromatographie

Eine analytische Gelfiltration der F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200 µl/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

## (B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>-akute-T-Zell-Leukämie Jurkat und die CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>-B-Zelllinie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5 × 10<sup>5</sup> Zellen in 50 µl RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 µl der F<sub>v</sub>-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 µl 10 µg/ml anti-c-myc-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 µl des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100 µl 1 µg/ml-Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

## (C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zelllinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und

1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard [<sup>51</sup>Cr]-Freisetzungstests bewertet; 2 × 10<sup>6</sup> Zielzellen wurden mit 200 µl Na [<sup>51</sup>Cr]O<sub>4</sub> (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von 2 × 10<sup>5</sup>/ml resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von 5 × 10<sup>6</sup>/ml eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in 100 µl wurden auf 104 Zielzellen/Vertiefung in 50 µl titriert. 50 µl Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach ange-  
 10 setzt und 4 h bei 37°C inkubiert. 100 µl des Überstands wurden gewonnen und auf [<sup>51</sup>Cr]-Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als: (experimentelle Freisetzung – spontane Freisetzung)/(– maximale Freisetzung – spontane Freisetzung) ×  
 15 100.

## Patentansprüche

1. Multivalentes F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.
2. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 0–10 Aminosäuren aufweisen.
3. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die Aminosäuresequenz GG aufweisen.
4. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–3, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt bivalent ist.
5. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Peptidlinker 2 11–20 Aminosäuren aufweist.
6. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub> aufweist.
7. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–3, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt tetravalent ist.
8. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7, wobei der Peptidlinker 2 3–10 Aminosäuren aufweist.
9. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.
10. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–9, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt multispezifisch ist.
11. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 10, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt bispezifisch ist.
12. F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–9, wobei das F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt monospezifisch ist.
13. Verfahren zur Herstellung des multivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1–12, wobei für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird.

14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivalente F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–12.
15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3 × 19-LL. 5
16. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3 × 19-SL.
17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-LL.
18. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-SL. 10
19. Verwendung des multivalenten F<sub>v</sub>-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1–12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind. 15

---

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

---

20

25

30

35

40

45

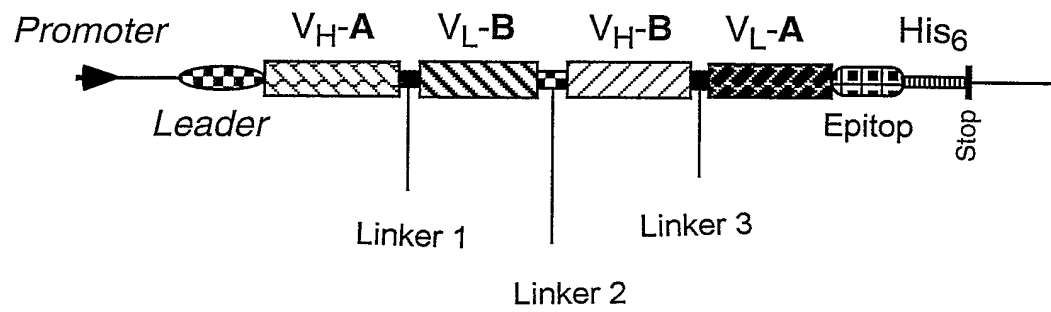
50

55

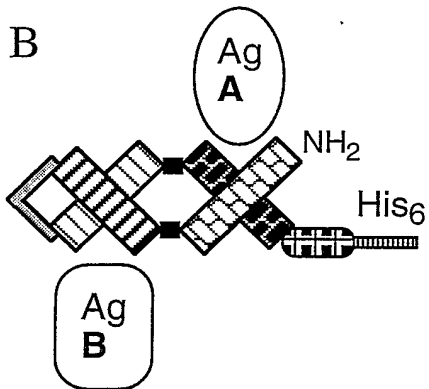
60

65

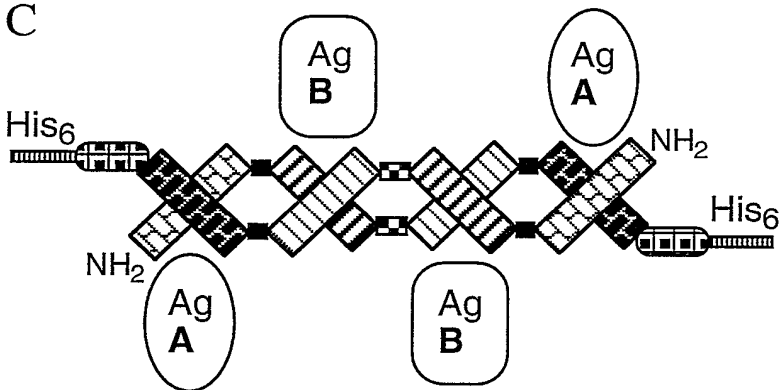
A



B

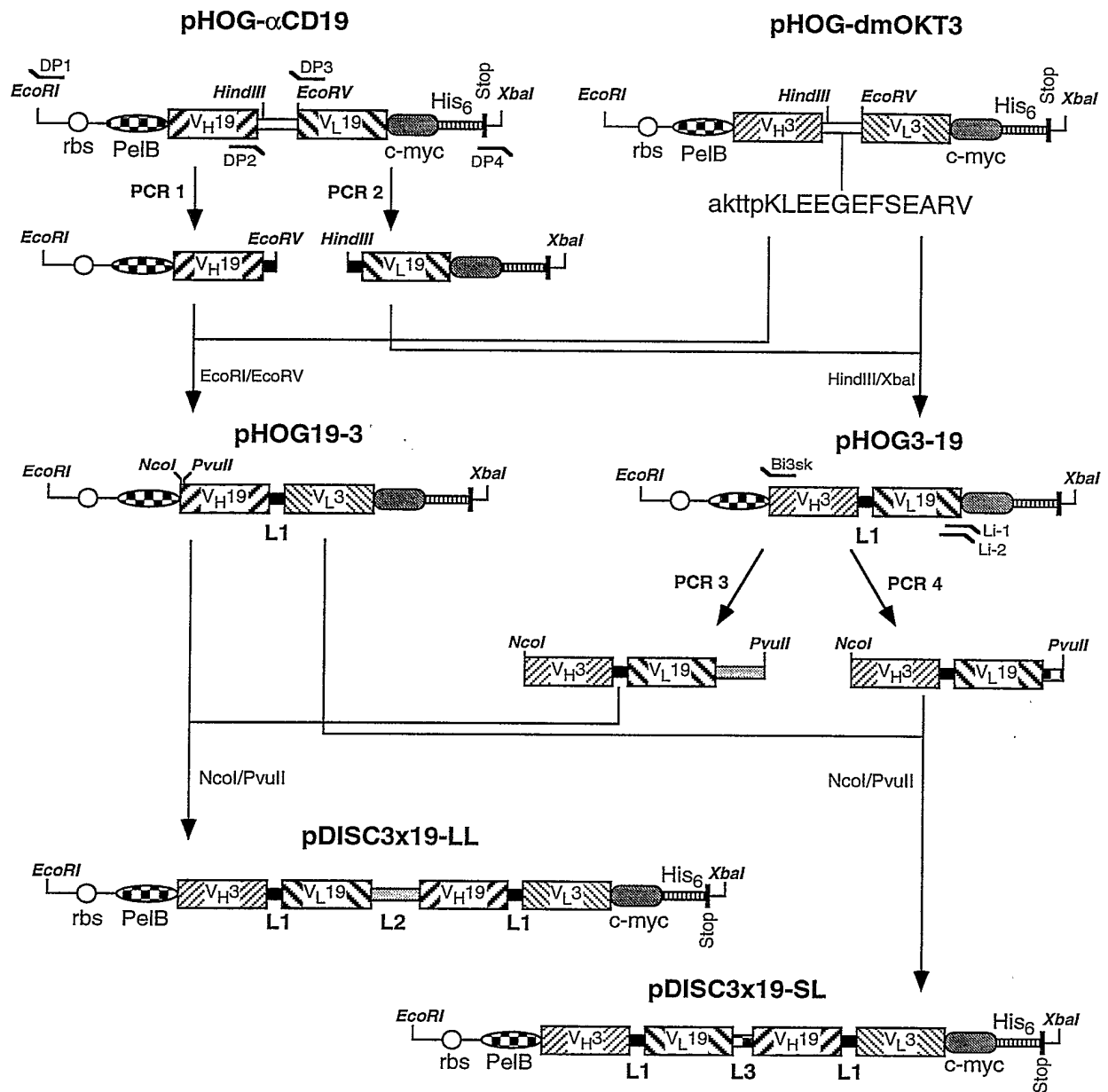


C

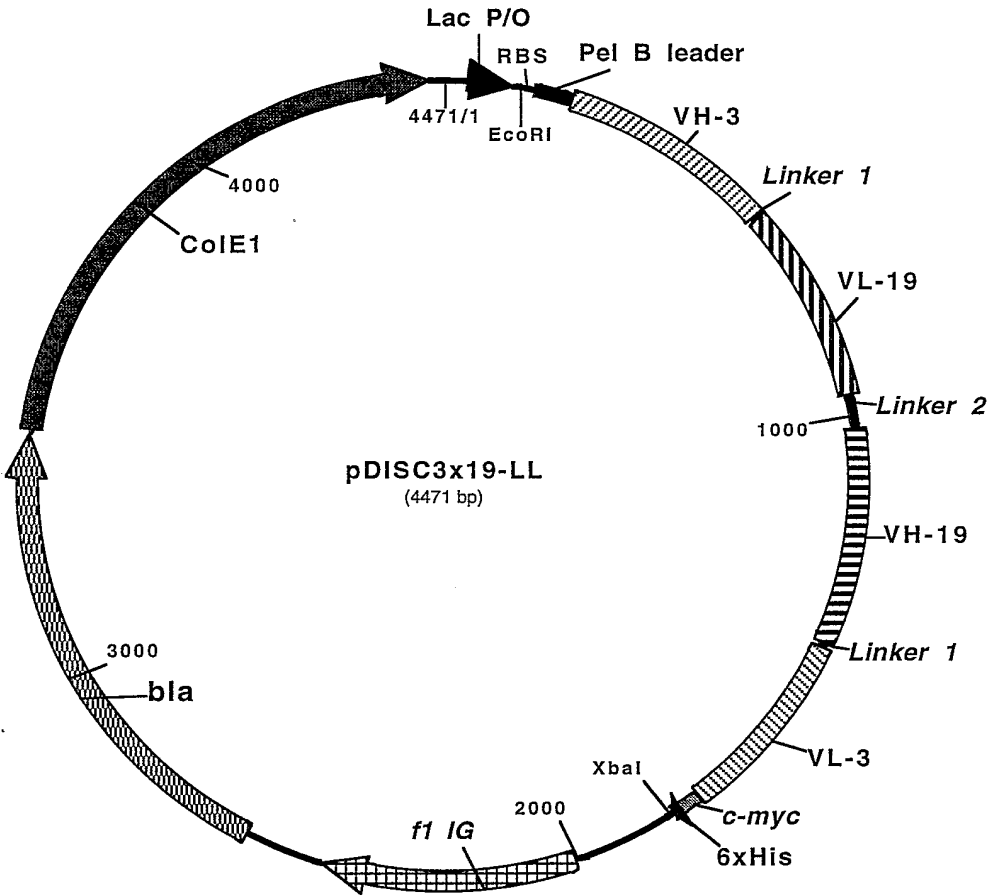


FIGUR 1

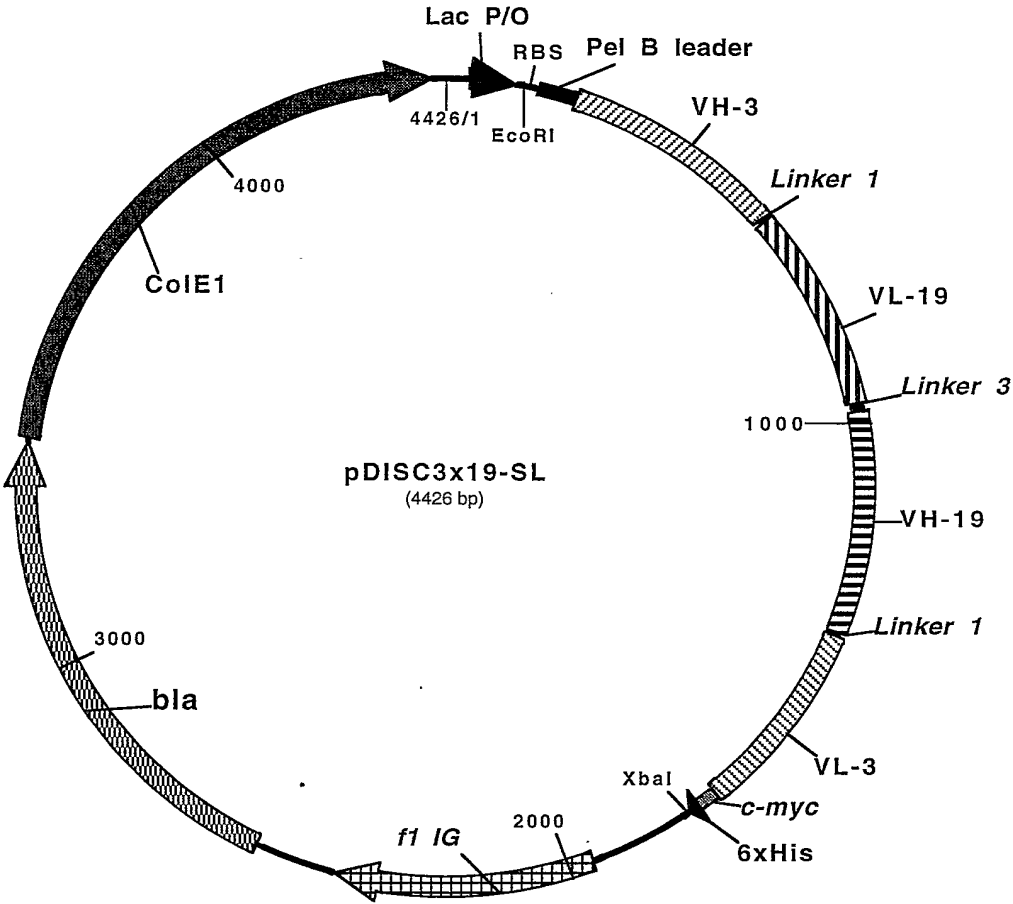




FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4

**EcoRI**      **RBS**      **PelB leader**      **NcoI**  
1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGGCCATGG  
1 M K Y L L P T A A A G L L L A A Q P A M  
\*      **Frame-H1**      **VH anti-CD3**  
92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC  
22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T  
**CDR-H1**      **Frame-H2**      **CDR-H2**  
183 TAGGTACACGATGCACCTGGGTAAACAGAGGCCTGGACAGGGCTCGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATAC  
52 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T  
**Frame-H3**  
267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC  
80 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T  
**CDR-H3**      **Frame-H4**  
354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA  
109 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L  
**CH1**      **Linker 1**      **Frame-L1**      **VL anti-CD19**  
440 CAGTCTCCTCAGCCAAACACACCAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGA  
138 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q  
**CDR-L1**      **Frame-L2**  
530 GGGCCACCCTCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAAGCTGGTACCAACAGATTCCAGGAC  
168 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G  
**CDR-L2**      **Frame-L3**  
614 AGCCACCCAAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCACCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT  
196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F  
**CDR-L3**      **Frame-L4**  
702 CACCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTGAGCAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGTGGA  
225 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G  
**C kappa**      **NotI**      **Linker 2**  
790 GGCACCAAGCTGGAATCAAAACGGCTGATGCTGCGGCCGCTGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGC  
255 G T K L E I K R A D A A A A G G G S G G G G S G G G G  
**PvuII**      **Frame-H1**      **VH anti-CD19**  
874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCCTGGGTCTCCTCAGTGAAGATTCTGCAAGG  
283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K  
**CDR-H1**      **Frame-H2**      **CDR-H2**  
962 CTTCTGGCTATGCATTCACTAGCTACTGGATGAAGCTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGACAGATTGGC  
312 A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W  
**PstI**      **Frame-H3**  
1049 CTGGAGATGGTGATACTAATACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGACGAATCTCCAGCACAGCCTACA  
341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y  
**CDR-H3**  
1133 TGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCGGTTATTACTAT  
369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y  
**Frame-H4**      **CH1**      **Linker 1**      **Frame-L1**  
1219 GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAACACACCAAGCTTGGCGGTGATATCGTGTCACTC  
398 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T  
**VL anti-CD3**      **CDR-L1**  
1307 AGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAATCGG  
427 Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N W  
**Frame-L2**      **CDR-L2**      **Frame-L3**  
1393 TACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCA  
456 Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G  
**CDR-L3**  
1481 GTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAA  
485 S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N  
**Frame-L4**      **C kappa**      **c-myc epitope**  
1569 CCCATTACCGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGATCTGCACCAACTGGATCCGAAACAAAGCTGATCTCAG  
514 P F T F G S G T K L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S  
**His6 tail**      **XbaI**  
1655 AAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAATCTAGA  
543 E E D L N S H H H H H H .

FIGUR 5

EcoRI RBS PelB leader NcoI  
 1 GAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCTTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCCGCGCATGG  
 1 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M  
 + Frame-H1 VH anti-CD3  
 92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC  
 22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T  
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2  
 183 TAGGTACACGATGCACCTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAAATCCTAGCCGTGGTTATAC  
 52 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T  
 Frame-H3  
 267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGAC  
 80 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T  
 CDR-H3 Frame-H4  
 354 ATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCA  
 109 S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L  
 CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19  
 440 CAGTCTCTCTCAGCCAAAACACCCAAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTACCCAAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGCAGA  
 138 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q  
 CDR-L1 Frame-L2  
 530 GGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC  
 168 R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G  
 CDR-L2 Frame-L3  
 614 AGCCACCCAAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCACCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT  
 196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F  
 CDR-L3 Frame-L4  
 702 CACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTGAGCAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTCCGTGGA  
 225 T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G  
 C kappa NotI Linker 3 PvuII Frame-H1  
 790 GGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCGGCCGCTGGTGGCCAGGGTTCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCT  
 255 G T K L E I K R A D A A A A G G P G S Q V Q L Q Q S G A E L  
 VH anti-CD19 CDR-H1 Frame-H2  
 879 GGTGAGGCCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAAGTGGTGAAGCAGAGCC  
 284 V R P G S S V K I S C K A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R  
 CDR-H2  
 968 CTGGACAGGCTCTTGAGTGGATTGGACAGATTTGGCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCC  
 314 P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y N G K F K G K A  
 Frame-H3  
 1051 ACTCTGACTGCAGACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTCGCAAGAC  
 342 T L T A D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R  
 CDR-H3 Frame-H4 CH1  
 1142 GGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTACCGCTCTCCTCAGCCAAAA  
 372 R E T T T V G R Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S A K  
 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD3  
 1226 CAACACCCAAAGCTTGGCGGTGATATCGTCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGCTGCATCTCCAGGGGAGAAGTCAACATGACCTGCA  
 400 T T P K L G G D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C  
 CDR-L1 Frame-L2 CDR-L2  
 1316 GTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAAGTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTATGACACATCCAA  
 430 S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K  
 Frame-L3  
 1401 ACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGC  
 458 L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A  
 CDR-L3 Frame-L4 C kappa  
 1491 TGCCACTTTATTACTGCGCAGTGGAGTAGTAACCCATTTCACGTTGCGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGATACCTGC  
 488 A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R A D T A  
 c-myc epitope His6 tail XbaI  
 1578 ACCAACTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAATCTAGA  
 517 P T G S E Q K L I S E E D L N S H H H H H H .

FIGUR 6

941 **ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC**  
1► M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

**alpha-factor signal**

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG  
25► T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT  
50► V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

**XhoI**

**EcoRI**

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTC**CAGGTGCAACTGCAGCAGTC**  
75► A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

**VH anti-CD3**

1234 **TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT**  
98► G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7

941 **ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC**  
1► M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

**alpha-factor signal**

1015 **AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATG**  
25► T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

**BsrDI**

1089 **TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT**  
50► V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

**XhoI****EcoRI**

1163 **GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG**  
75► A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

**VH anti-CD3**

1235 **CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT**  
99► Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8